

<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет –  
МСХА им. К. А. Тимирязева,  
127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,  
info@rgau-msha.ru

<sup>2</sup>Всероссийский центр карантина растений ФГБУ «ВНИИКР»  
140150, Россия, Московская обл., Раменский р-н,  
п. Быково, ул. Пограничная, 32,  
office@vniikr.ru

## РЕКОМЕНДУЕМЫЙ ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ *ACIDOVORAX CITRULLI* В СЕМЕНАХ

**Ключевые слова:** *Acidovorax citrulli*, полимеразная цепная реакция, диагностика.

Возбудитель бактериальной пятнистости культур семейства *Cucurbitaceae*, *A.citrulli* представляет собой потенциальную угрозу производству продукции тыквенных культур на территории Российской Федерации, в связи с чем в 2017 году бактерия была включена в перечень карантинных для нашей страны объектов. Наиболее вероятный путь проникновения бактерии на территорию РФ – импорт семян [1].

В настоящий момент при создании лабораторной пробы опираются на следующие источники:

- одного зараженного семени достаточно, чтобы отклонить партию, состоящую из 30000 семян [2]. Таким образом, чтобы найти зараженное семя, необходимо воспринимать всю партию как образец;
- поступивший в лабораторию образец следует разделять минимум на 2 повторности, каждая из которых содержит максимум 5000 семян [3]. Минимальное число семян в повторности не указано, что зачастую ставит исследователя в тупик. Кроме того, нет параметров определения репрезентативной выборки от партии;
- для проведения исследований необходимо минимум 10000 семян [3]. Масса навески из 5000 семян, в зависимости от культуры, может сильно варьировать (от 120 г для *Cucumis sativus* до 1000 г для *Cucurbita maxima*) [4]. Помимо убыточности такого исследования для производителя семян, следует отметить, что чем больше объем семян в повторности, тем сложнее может быть процесс формирования лабораторной пробы.

Исходя из вышеописанных проблем, была поставлена задача: определить размер минимальной репрезентативной выборки, позволяющей с высокой вероятностью диагностировать *A.citrulli* в семенах.

В процессе решения данной задачи на основании проведенных исследований были сформулированы следующие выводы:

- так как основным для выявления и идентификации *A.citrulli* в семенах является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), ключевую роль играет не возможное количество зараженных семян в партии, а степень заражения этих семян. Такой вывод сделал затруднительным поиск подходящей матема-

тической формулы, позволяющей достоверно определить объем репрезентативной выборки;

- принимая, что в партии очень низкий процент зараженных семян (например, 0,0033%, что соответствует одному зараженному семени в партии, состоящей из 30000 семян), подготовка лабораторной пробы из 5000 семян, даже для мелкосеменных культур, покажет результат обнаружения на пределе чувствительности метода ПЦР, причем с вероятностью менее 17%;

- фактически объем семян для проведения анализа, поступающий в лабораторию, всегда разный (от 10 семян; в редких случаях партия так велика, что производитель может позволить себе отдать на исследование 10000 штук);

- важную роль в исследовании играют параметры лабораторного оборудования. Например, для концентрирования бактериальных клеток используются емкости, вмещающие до 50 мл жидкости. Замачивание 1000 г семян в 2000 мл буфера и последующий отбор 50 мл для концентрирования сопряжен с риском потерять целевые клетки.

В связи с большим количеством факторов, влияющих на определение оптимального объема выборки, поставленная задача все еще находится на стадии решения. Кроме того, схожие проблемы существуют и в диагностике других заболеваний, передающихся семенами.

Диагностику *A.citrulli* в семенах рекомендуется проводить следующим образом: сформировать две навески семян массой до 25 г (если масса поступивших для исследования семян 25 г и менее, формируется одна навеска). Добавить фосфатно-солевой буфер (PBS) [3] в соотношении 2:1, шейкировать 20–24 часа при низких оборотах (до 90 об/мин). Очистить весь экстракт от крупных частиц с помощью бумажного фильтра «синяя лента», размер пор 3–5 мкм. Центрифугировать при 10000 об/мин 15 минут при 4 °С. Слить супернатант, ресуспендировать осадок в 1 мл PBS. 200 мкл использовать для выделения ДНК, остальное хранить при –18... – 22 °С с добавлением 1–2 капель глицерина.

Выделение ДНК проводить любым способом, подходящим для бактериальных клеток, в том числе используя коммерческие наборы в соответствии с инструкцией производителя. Рекомендуется использовать ручной способ выделения набором фирмы ЗАО «АгроДиагностика» «Проба-ГС», так как данный набор обеспечивает наибольшую чувствительность метода ПЦР, являясь при этом простым в использовании.

Для идентификации методом ПЦР в режиме «реального времени» рекомендуется использовать тест-систему с праймерами Acit 1 F/R и зондом Acit 1-probe [5] в сочетании с готовым мастер-миксом фирмы ЗАО «Диалат» 5X Mas<sup>CFE</sup>TaqMIX-2025. Также можно использовать готовые ПЦР-наборы фирм ЗАО «Синтол» или ЗАО «АгроДиагностика».

Все тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени могут показывать ложноположительные реакции примерно в одном случае из 25. Это предположительно связано с бактериями, входящими в состав сопутствующей микрофлоры. Такие образцы рекомендуется проверять методом классической ПЦР с праймерами SEQ ID3/4 [6] в сочетании с готовым ПЦР-миксом фирмы ЗАО «Диалат» 5X Mas<sup>DD</sup>TaqMIX –2025, а также использовать культурально-морфологический метод с последующим подтверждением выделенных колоний методом ПЦР.

### Список литературы

1. Шнейдер Е. Ю., Каримова Е. В. АФР возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Shaad et al.) для территории РФ. 2013.
2. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* / O. Bahar, M. Efrat, E. Hadar, B. Dutta, R. R. Walcott, S. Burdman // Plant Pathology. 2008. Vol. 57. P. 754–763.
3. PM7/127(1) *Acidovorax citrulli* // EPPO. 2016.
4. Grubben G. J. H., Denton O. A. Plant resources for tropical Africa 2. Vegetables. PROTA Foundation, Wageningen, NL, Backhuys Publishers, Leiden NL // СТА Wageningen. 2004. 668 p.
5. Woudt B., Koenraadt H. M. S., Oosterhof J., van Betteray B. Development of specific primers for the molecular detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Proceedings of the EPPO Conference on diagnostics. 2009. URL: [http://archives.eppo.int/MEETINGS/2009\\_conferences/diagnostic/Diag\\_York2009\\_brochure.pdf](http://archives.eppo.int/MEETINGS/2009_conferences/diagnostic/Diag_York2009_brochure.pdf).
6. Shaad N. W., Song W. Y., Hatziloukas E. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. 2000. US Patent 6, 146, 834.

УДК 632.4:635.2:635.21

К. О. Дейч<sup>1</sup>, М. М. Никитин<sup>1</sup>,  
Н. В. Стацюк<sup>2</sup>, В. Г. Джавахия<sup>2</sup>,  
А. Г. Голиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «ГенБит»,  
117246, Россия, Москва, пр. Научный, 20 стр. 2,  
[golikov@genbitgroup.com](mailto:golikov@genbitgroup.com);

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский  
институт фитопатологии,  
143050, Россия, Московская обл., р.п. Большие Вяземы,  
ул. Институт, вл. 5,  
[nataafg@gmail.com](mailto:nataafg@gmail.com)

### РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ РАКА КАРТОФЕЛЯ (*SYNCHYTRIUM ENDOBIOITICUM*) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ\*

**Ключевые слова:** *Synchytrium endobioticum*, картофель, ПЦР в реальном времени, экспресс-диагностика.

\*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16–16–04109).

© Дейч К. О., Никитин М. М., Стацюк Н. В., Джавахия В. Г., Голиков А. Г., 2018